

0 / 509307
27 SEP 2004

PCT/JP03/04120

日本特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

01.04.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日
Date of Application:

2002年 3月 29日

REC'D 23 MAY 2003

PCT

出願番号
Application Number:

特願 2002-095442

[ST.10/C]:

[JP 2002-095442]

出願人
Applicant(s):

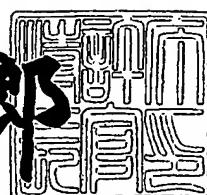
セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社
第一製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 5月 9日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特 2003-3033414

【書類名】 特許願
【整理番号】 NP02-1027
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 A61K 38/17
【発明の名称】 c-Jun リン酸化阻害剤 (KIAA1491.com
plete)
【請求項の数】 22
【発明者】
【住所又は居所】 千葉県千葉市美浜区中瀬1丁目3番地
幕張テクノガーデンD棟17階
セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社内
【氏名】 土居 洋文
【発明者】
【住所又は居所】 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号
第一製薬株式会社 東京研究開発センター内
【氏名】 和田 直也
【発明者】
【住所又は居所】 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号
第一製薬株式会社 東京研究開発センター内
【氏名】 中島 弘人
【特許出願人】
【識別番号】 500520628
【氏名又は名称】 セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社
【特許出願人】
【識別番号】 000002831
【氏名又は名称】 第一製薬株式会社
【代理人】
【識別番号】 100088904
【弁理士】

特2002-095442

【氏名又は名称】 庄司 隆

【電話番号】 03-3864-6572

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 067070

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 c-Junリン酸化阻害剤 (KIAA1491 comp
lete)

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の群から選ばれるペプチド；

- ①配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド、
- ②配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチドを含有するペプチド、
- ③配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列の少なくとも5個の連続するアミノ酸残基を有するペプチド、

および

- ④前記ペプチドにおいて1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加あるいは挿入といった変異を有し、c-Jun N末端キナーゼ3と相互作用するペプチド

【請求項2】 下記の群から選ばれるペプチドであって、c-Jun N末端キナーゼ3と相互作用するペプチド；

- ①配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド、
- ②配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチドを含有するペプチド、
- ③配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列の少なくとも5個の連続するアミノ酸残基を有するペプチド、

および

- ④前記ペプチドにおいて1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加あるいは挿入といった変異を有するペプチド。

【請求項3】 請求項2に記載のペプチドからなるc-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化阻害剤。

【請求項4】 請求項2に記載のペプチドを用いることを特徴とするc-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化の阻害方法。

【請求項5】 請求項3に記載のリン酸化阻害剤からなるc-Junの転写

活性化能の阻害剤。

【請求項6】 請求項2に記載のペプチドによりc-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junリン酸化を阻害することを特徴とするc-Junの転写活性化能の阻害方法。

【請求項7】 請求項1または2に記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖。

【請求項8】 配列表の配列番号2に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチド。

【請求項9】 請求項7または8に記載のポリヌクレオチドまたはその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド。

【請求項10】 請求項7から9のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

【請求項11】 請求項10に記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

【請求項12】 請求項11に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項1または2に記載のペプチドの製造方法。

【請求項13】 請求項1または2に記載のペプチドを免疫学的に認識する抗体。

【請求項14】 請求項2に記載のペプチドと相互作用して該ペプチドのc-Jun N末端キナーゼ3との相互作用を阻害若しくは促進する化合物、および/または請求項7から9のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害若しくは促進する化合物の同定方法であって、請求項1若しくは2に記載のペプチド、請求項7から9のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、請求項10に記載のベクター、請求項11に記載の形質転換体、請求項13に記載の抗体のうちの少なくともいずれか1つを用いることを特徴とする方法。

【請求項15】 請求項1または2に記載のペプチド、請求項3に記載のリン酸化阻害剤、請求項5に記載の転写活性化能の阻害剤、請求項7から9のいず

れか1項に記載のポリヌクレオチド、請求項10に記載のベクター、請求項11に記載の形質転換体、および請求項13に記載の抗体のうちの少なくともいずれか1つを含有してなる医薬組成物。

【請求項16】 請求項15に記載の医薬組成物を含んでなる、c-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および/または治療剤。

【請求項17】 前記c-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患が神経変性疾患である請求項16に記載の防止および/または治療剤。

【請求項18】 前記神経変性疾患がポリグルタミン病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、球脊髄性筋萎縮症、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、Lewy小体型痴呆症、多系統萎縮症、家族性筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、pick病、ファミリアル ブリティッシュ デメンチア (familial British dementia)、クロイツフェルト-ヤコブ (Creutzfeldt-Jakob) 病、ゲルストマン-ストラッスラー (Gerstmann-Strässler) 症候群、狂牛病 (ウシ海綿状脳症) (BSE)、またはニューロセルピン (neuroserpin) 封入体を伴う家族性痴呆症である請求項17に記載の防止および/または治療剤。

【請求項19】 請求項15に記載の医薬組成物を用いることを特徴とする、c-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および/または治療方法。

【請求項20】 請求項2に記載のペプチドまたは請求項7から9のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドによりc-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化を阻害することを特徴とする、c-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および/または治療方法。

【請求項21】 前記c-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患が神経変性疾患である請求項20に記載の防止および/または治療方法。

【請求項22】 前記神経変性疾患がポリグルタミン病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、球脊髄性筋萎縮症、歯状核赤核淡苔球ルイ体萎縮症、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、Lewy小体型痴呆症、多系統萎縮症、家族性筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、pick病、ファミリアル ブリティッシュ デメンチア (familial British dementia)、クロイツフェルト-ヤコブ (Creutzfeldt-Jakob) 病、ゲルストマン-ストラッサー (Gersmann-Strässler) 症候群、狂牛病 (ウシ海綿状脳症) (BSE)、またはニューロセルピン (neuroserpin) 封入体を伴う家族性痴呆症である請求項21に記載の防止および/または治療方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、c-Jun N末端キナーゼ3 (以下、JNK3と略称する) と相互作用してリン酸化される新規蛋白質に関するものである。さらに詳しくは、当該蛋白質のアミノ酸配列の全部または一部を有するペプチド；当該ペプチドのアミノ酸配列の1個ないし数個のアミノ酸残基が変異したアミノ酸配列を有するペプチド；当該ペプチドをコードするポリヌクレオチド若しくはその相補鎖；当該ポリヌクレオチド若しくはその相補鎖を含有する組換えベクター；当該組換えベクターで形質転換された形質転換体；当該ペプチドに対する抗体；当該形質転換体または当該組換えベクターを使った当該ペプチドの製造方法；当該ペプチドまたはポリヌクレオチドと相互作用を有する化合物のスクリーニング方法に関する。さらにまた、前記ペプチドであってJNK3と相互作用するペプチドによりJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することによるc-Junの機能抑制、例えば転写活性化能抑制；これを利用したアポトーシス抑制、例えば神経細胞のアポトーシス抑制；並びに神経変性疾患などの防止および/または治療；に用いる薬剤、医薬組成物およびその方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

c-Jun N末端キナーゼ（以下、JNKと略称する）は、MAPキナーゼスーパーファミリーの1つである。しかしながら、JNKは古典的MAPキナーゼ（ERK）とは異なり、増殖刺激ではほとんど活性化せず、細胞に対するストレス、例えばDNA損傷、紫外線、熱、高浸透圧、ERストレス、および活性酸素など並びに炎症性サイトカイン、例えば腫瘍壞死因子（TNF）やインターロイキン1など、により活性化する。

【0003】

JNKがストレス応答により活性化され、アポトーシスに関与することは、JNKの活性化が神経成長因子（NGF）除去による神経系細胞株PC12細胞の細胞死において観察されたことなどから、従来知られていた。近年、JNKがカスパーーゼ（caspase）依存的なアポトーシスの調節に作用すること、またカスパーーゼ非依存的にJNK依存的なアポトーシスが起こることが報告されている。さらに、哺乳類において病理的（神経変性疾患）に起こる細胞死の多くが、カスパーーゼ非依存的に起こることが明らかになってきた〔北中 千史ら、Molecular medicine (2000) 37: 408-418〕。

【0004】

アポトーシスには転写依存的な細胞死（例えば神経栄養因子除去による交感神経死やDNA損傷による死）と、転写非依存的な細胞死（例えば紫外線照射による死やFasによる死）があるが、JNKは両方への関与が示唆されている。転写依存的な細胞死では、JNKがc-Junのアミノ酸配列中第63番目および第73番目のセリン（S）をリン酸化して活性化せしめることが認められている。例えば、c-Junのリン酸化部位をアラニン（A）に置換した変異体（A63、A73）のノックインマウスでは、カイニン酸投与による神経死が顕著に抑制された〔Behrens, A. et al., Nature Genet. (1999) 21: 326-329〕。c-Junはトランスアクチベーターであり、遺伝子の発現制御部位に結合して、その遺伝子の転写を促進する転写活性化能を有する。したがって、c-Junはその下流でなんらかのアポトーシス促進因子、例えばBimおよびFasLなど、の転写を誘導すると予想されている。

【0005】

現在、哺乳類には、3種類のJNK遺伝子、すなわちJNK1、JNK2、およびJNK3、が見い出されている。このうち、JNK3は脳神経系などに特異的に発現しており、低酸素状態などのショック的状況で発現して脳機能に障害を与えることが知られている。また、JNK3をノックアウトすると、カイニン酸投与による興奮性神経死が抑制されることが報告されている [Yang, D. D. et al., Nature (1997) 389: 865-870]。

【0006】

したがって、JNK3のシグナル経路を阻害することにより、JNK3のシグナル経路の異常によって引き起こされる疾患、例えば細胞のアポトーシスに基づく疾患、具体的には神経変性疾患など、の解明並びに防止および／または治療が可能になると考えられる。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、JNK3のシグナル経路を阻害する物質を見い出し、JNK3のシグナル経路の異常によって引き起こされる疾患、例えば細胞のアポトーシスに基づく疾患、具体的には神経変性疾患など、の防止および／または治療手段を提供しようとするものである。

【0008】

【課題解決のための手段】

上記課題を解決すべく本発明者らは銳意努力し、JNK3と相互作用するペプチド（配列表の配列番号1）により、JNK3によるc-Junのリン酸化が阻害されることを見い出し、本発明を完成した。

【0009】

すなわち本発明は、

(1) 下記の群から選ばれるペプチド；

①配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド、

②配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチドを含有するペプチド、

③配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列の少なくとも5個の連続するアミノ

酸残基を有するペプチド、

および

④前記ペプチドにおいて1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加あるいは挿入といった変異を有し、JNK3と相互作用するペプチド、

(2) 下記の群から選ばれるペプチドであって、JNK3と相互作用するペプチド；

①配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド、

②配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチドを含有するペプチド、

③配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列の少なくとも5個の連続するアミノ酸残基を有するペプチド、

および

④前記ペプチドにおいて1ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加あるいは挿入といった変異を有するペプチド、

(3) 前記(2)のペプチドからなるJNK3によるc-Junのリン酸化阻害剤、

(4) 前記(2)のペプチドを用いることを特徴とするJNK3によるc-Junのリン酸化の阻害方法、

(5) 前記(3)のリン酸化阻害剤からなるc-Junの転写活性化能の阻害剤、

(6) 前記(2)のペプチドによりJNK3によるc-Junリン酸化を阻害することを特徴とするc-Junの転写活性化能の阻害方法、

(7) 前記(1)または(2)のペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖、

(8) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチド、

(9) 前記(7)または(8)のポリヌクレオチドまたはその相補鎖とストリ

ンジエントな条件下でハイブリダイゼーションするポリヌクレオチド、

(10) 前記(7)から(9)のいずれかのポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、

- (11) 前記(10)の組換えベクターで形質転換された形質転換体、
- (12) 前記(11)の形質転換体を培養する工程を含む、前記(1)または(2)のペプチドの製造方法、
- (13) 前記(1)または(2)のペプチドを免疫学的に認識する抗体、
- (14) 前記(2)のペプチドと相互作用して該ペプチドのJNK3との相互作用を阻害若しくは促進する化合物、および／または前記(7)から(9)のいずれかのポリヌクレオチドと相互作用してその発現を阻害若しくは促進する化合物の同定方法であって、前記(1)若しくは(2)のペプチド、前記(7)から(9)のいずれかのポリヌクレオチド、前記(10)のベクター、前記(11)の形質転換体、前記(13)の抗体のうちの少なくともいずれか1つを用いることを特徴とする方法、
- (15) 前記(1)または(2)のペプチド、前記(3)のリン酸化阻害剤、前記(5)の転写活性化能の阻害剤、前記(7)から(9)のいずれかのポリヌクレオチド、前記(10)のベクター、前記(11)の形質転換体、および前記(13)の抗体のうちの少なくともいずれか1つを含有してなる医薬組成物、
- (16) 前記(15)の医薬組成物を含んでなる、JNK3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療剤、
- (17) 前記JNK3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患が神経変性疾患である前記(16)の防止および／または治療剤、
- (18) 前記神経変性疾患がポリグルタミン病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、球脊髄性筋萎縮症、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、アルツハイマー病、ダウ症、パーキンソン病、Lewy小体型痴呆症、多系統萎縮症、家族性筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、pick病、ファミリアル ブリティッシュ デメンチア(familial British dementia)、クロイツフェルト-ヤコブ(Creutzfeldt-Jakob)病、ゲルストマン-ストラッサー(Gerstmann-Strässler)症候群、狂牛病(ウシ海綿状脳症)(BSE)、またはニューロセルピン(neuroserpin)封入体を伴う家族性痴呆症である前記(17)の防止および／または治療剤、

(19) 前記(15)の医薬組成物を用いることを特徴とする、JNK3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および/または治療方法、

(20) 前記(2)のペプチドまたは前記(7)から(9)のいずれかのポリヌクレオチドによりJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することを特徴とする、JNK3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および/または治療方法、

(21) 前記JNK3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患が神経変性疾患である前記(20)の防止および/または治療方法、

(22) 前記神経変性疾患がポリグルタミン病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、球脊髄性筋萎縮症、歯状核赤核淡苔球ルイ体萎縮症、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、Lewy小体型痴呆症、多系統萎縮症、家族性筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、pick病、ファミリアル ブリティッシュ デメンチア(familial British dementia)、クロイツフェルト-ヤコブ(Creutzfeldt-Jakob)病、ゲルストマン-ストラッサー(Gerstmann-Strässler)症候群、狂牛病(ウシ海綿状脳症)(BSE)、またはニューロセルピン(neuroserpin)封入体を伴う家族性痴呆症である前記(21)の防止および/または治療方法、

からなる。

【0010】

【発明の実施の形態】

本発明においては、JNK3と相互作用するヒト蛋白質を国際公開第WO01/67299号公報記載の方法により予測し、当該蛋白質としてかずさDNA研究所データベースHUGEに登録されている機能未知の蛋白質KIAA1491(GenBank、アクセスション番号:AB040924)を見い出した。さらに、欠失していると考えられるKIAA1491のN末端側領域をコードしているcDNA配列がQV1-MT0132-201100-498-b05MT0132 Homo sapiens cDNA (GenBank、アクセスション番号:BF894928)配列に相当することをインシリコで予測した。

これらから、完全長のKIAA1491（以下、KIAA1491 completeと呼ぶ）をコードする塩基配列（配列表の配列番号2）を得た。KIAA1491 complete遺伝子のオープンリーディングフレーム（ORF）全長は2361塩基対、当該遺伝子の遺伝子産物は786アミノ酸残基（配列表の配列番号1）からなる。当該遺伝子およびその遺伝子産物については今までに報告されていない。また、KIAA1491 complete cDNAに対応するmRNAが脳に存在することは、ヒト脳由来のpolyA RNAを用いた逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）により確認した。

【0011】

KIAA1491 completeをヒト脳cDNAから遺伝子工学的手法により得てJNK3との相互作用を実験的に検討した結果、JNK3によりリン酸化されること、さらにJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することを見い出した。すなわち、KIAA1491 completeがJNK3と相互作用することにより、JNK3とc-Junとの相互作用が阻害され、その結果c-Junのリン酸化が阻害されると考えられる。

【0012】

JNK3によるc-Junのリン酸化はアポトーシス、例えば神経細胞死に関与していることが報告されている [Behrens, A. et al., Nature Genet. (1999) 21: 326-329]。また、c-Junはトランスアクチベーターであり、遺伝子の発現制御部位に結合して当該遺伝子の転写を促進する転写活性化能を有し、そのシグナル経路の下流でなんらかのアポトーシス促進因子、例えばBimおよびFasLなど、の転写を誘導すると予想されている。

【0013】

のことから、KIAA1491 completeを用いてJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することにより、c-Junの転写活性化能を抑制することができ、さらにはJNK3によるc-Junのリン酸化により引き起こされる生理的現象、例えばアポトーシスを抑制することが可能と考えられる。また、JNK3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患、例えば神経細胞死が係る

神経変性疾患などの防止および／または治療が可能である。

【0014】

(ペプチド)

上記発見に基づき、本発明においては、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチドを提供する。また、本発明において提供されるペプチドは、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチドを含有するペプチドであり得る。ここでペプチドとは、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合により互いに結合している2個またはそれ以上のアミノ酸を意味し、オリゴペプチド、ポリペプチド、蛋白質を包含する。以降、アミノ酸を表記する場合、1文字にて表記することがある。

【0015】

また、配列表の配列番号1に記載のペプチドの部分配列を有するペプチドを提供可能である。当該ペプチドは、その最小単位として5個以上のアミノ酸、好ましくは8個以上のアミノ酸、より好ましくは12個以上、さらに好ましくは15個以上の連続するアミノ酸からなるものである。これらは、試薬若しくは標準物質等として利用できる。これらのペプチドのうち、JNK3と相互作用するものは、JNK3によるc-Junのリン酸化を阻害する物質として有用である。また、免疫学的に認識され得るペプチド、例えばエピトープペプチドは後述するようにKIAA1491 completeに対する抗体を作製するための抗原として単独またはキャリア（例えば、キーホールリンペイトヘモシアニンまたは卵白アルブミン）と結合して使用できる。

【0016】

さらに、このように特定されたペプチドを基にして、JNK3との相互作用、例えばリン酸化を指標にして、1個以上、例えば1～100個、好ましくは1～30個、より好ましくは1～20個、さらに好ましくは1～10個、特に好ましくは1個ないし数個のアミノ酸の欠失、置換、付加あるいは挿入といった変異を有するアミノ酸配列からなるペプチドも提供される。変異を有するペプチドは天然に存在するものであってよく、また変異を導入したものであってもよい。欠失、置換、付加あるいは挿入などの変異を導入する場合、その手段は自体公知であ

り、例えば、部位特異的変異導入法、遺伝子相同組換え法、プライマー伸長法またはポリメラーゼ連鎖増幅法（PCR）を単独または適宜組み合わせて、例えばサムブルック等編〔モレキュラークローニング、アラボラトリーマニュアル第2版〕コールドスプリングハーバーラボラトリー、1989、村松正實編〔ラボマニュアル遺伝子工学〕丸善株式会社、1988、エールリッヒ、H.E.編〔PCRテクノロジー、DNA増幅の原理と応用〕ストックトンプレス、1989等の成書に記載の方法に準じて、あるいはそれらの方法を改変して実施することができ、例えばUlmmerの技術〔Science (1983) 219: 666〕を利用することができる。上記のような変異の導入において、当該ペプチドの基本的な性質（物性、活性、または免疫学的活性等）を変化させないという観点からは、例えば、同族アミノ酸（極性アミノ酸、非極性アミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、陽性荷電アミノ酸、陰性荷電アミノ酸、芳香族アミノ酸等）の間での相互置換は容易に想定される。

【0017】

本発明に係るペプチドの検出または精製を容易にするために、あるいは別の機能を付加するために、N末端側やC末端側に別の物質を結合したペプチドも本発明の範囲に包含される。結合される物質としては、例えばグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、IgG等の免疫グロブリンFc断片、またはFLAG-tagなどのペプチドなどが挙げられる。これらを直接またはリンカーペプチド等を介して間接的に、遺伝子工学的手法等を用いて付加することは当業者には容易である。

【0018】

(ポリヌクレオチド)

本発明においては、上記ペプチドをコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖を提供する。例えば、本発明に係るポリヌクレオチドは、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび該ポリヌクレオチドに対する相補鎖であり得る。好ましくは、配列表の配列番号2に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドである。これらは例えば上記ペプチドの製造に有用な遺伝子情報を提供するものであり、あるいは核酸に関する試

薬または標準品としても利用できる。

【0019】

また、本発明に係るペプチドのアミノ酸配列、例えば配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、好ましくは配列表の配列番号2に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチドまたはその相補鎖の対応する領域にストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供可能である。ハイブリダイゼーションの条件は、例えばサムブルック等編【モレキュラークローニング、アラボラトリーマニュアル 第2版】コールドスプリングハーバーラボラトリー(1989)等に従うことができる。これらのポリヌクレオチドは目的のポリヌクレオチド、特に配列表の配列番号2に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖にハイブリダイズするものであれば必ずしも相補的配列でなくともよい。

【0020】

本発明に係るポリヌクレオチドは、また、指定された塩基配列の領域に対応する連続する10個以上のヌクレオチド、好ましくは15個以上、より好ましくは20個以上のヌクレオチドを有するポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチドおよびそれらの相補鎖を包含する。これらのポリヌクレオチドは、KIAA1491 complete遺伝子若しくはmRNAの検出のためのプローブ若しくはプライマーとして、または該遺伝子発現を調節するためのアンチセンスオリゴヌクレオチド等として有用である。

【0021】

上記ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、例えば公知の蛋白質発現系を利用して発現蛋白質の確認を行い、その生理活性、例えばJNK3との相互作用やJNK3によるリン酸化を指標にして得ることができる。蛋白質発現系としては、無細胞蛋白質発現系を利用する場合は、例えば胚芽、家兎網状赤血球等由来のリボソーム系の技術を利用できる【Nature(1957)179:160~161】。

【0022】

(組換えペクター)

上記ポリヌクレオチドを適當なベクターDNAに組み込むことにより、組換えベクターが得られる。用いるベクターDNAは、宿主の種類および使用目的により適宜選択される。ベクターDNAは、天然に存在するものを抽出したもののか、増殖に必要な部分以外のDNAの部分が一部欠落しているものでもよい。例えば、染色体、エピソームおよびウイルス由来のベクター、例えば細菌プラスミド由来、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来、酵母エピソーム由来、挿入エレメント由来、酵母染色体エレメント由来、例えばバキュロウイルス、パボバウイルス、SV40、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルス等のウイルス由来のベクター、並びにそれらを組み合わせたベクター、例えばプラスミドおよびバクテリオファージの遺伝学的エレメント由来のベクター、例えばコスミドおよびファージミド等が挙げられる。また、目的により発現ベクターやクローニングベクター等を用いることができる。

【0023】

組換えベクターは、目的の遺伝子配列と複製そして制御に関する情報を担持した遺伝子配列、例えばプロモーター、リボソーム結合部位、ターミネーター、シグナル配列、エンハンサー等、とを構成要素とし、これらを自体公知の方法により組み合わせて作製される。前記ベクターDNAに本発明に係るポリヌクレオチドを組み込む方法は、自体公知の方法を適用し得る。例えば、適當な制限酵素を選択、処理してDNAを特定部位で切断し、次いで同様に処理したベクターとして用いるDNAと混合し、リガーゼによって再結合する方法が用いられる。あるいは、目的のポリヌクレオチドに適當なリンカーをライゲーションし、これを目的に適したベクターのマルチクローニングサイトへ挿入することによっても、所望の組換えベクターが得られる。

【0024】

(形質転換体)

上記ポリヌクレオチドが組み込まれたベクターDNAを、自体公知の宿主、例えば大腸菌、酵母、枯草菌、昆虫細胞、または動物細胞等に自体公知の方法で導入することにより形質転換体が得られる。遺伝子の導入を行う場合、より好まし

い系としては遺伝子の安定性を考慮するならば染色体内へのインテグレート法が挙げられるが、簡便には核外遺伝子を利用した自律複製系を使用できる。ベクター-DNAの宿主細胞への導入は、例えば、サムブルック等編【モレキュラークローニング、アラボラトリーマニュアル】コールド_スプリング_ハーバー_ラボラトリ_プレス、1989等に記載されている標準的な方法により行うことができる。具体的には、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、マイクロインジェクション、陽イオン脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレープ負荷(scrape loading)、バリスティック導入(ballistic introduction)および感染等が挙げられる。

【0025】

(ペプチドの製造)

本発明に係るペプチドは、その塩基配列の情報、例えば配列表の配列番号2、に基づいて、公知の遺伝子工学的手法により得ることが可能である。例えば、当該塩基配列にしたがって設計し公知の方法で合成したプライマーを用いて、ヒト脳由来cDNAライブラリーを用いて目的の遺伝子を増幅し、発現ベクターに挿入して宿主細胞に導入し、当該ペプチドを発現する細胞を構築し、当該細胞から公知の方法で目的のペプチドを抽出して精製することにより得られる。また、公知の無細胞蛋白質合成系を利用して合成することも可能である

【0026】

例えば、ベクター-DNAとして発現ベクターを使用して、目的のペプチドをコードするポリヌクレオチドを挿入する。得られたベクターを導入した形質転換細胞を、自体公知の各々の宿主の培養条件に最適な条件を選択して培養し、その培養液または細胞自体から、目的のペプチドを回収する。ペプチドの回収は、分子篩、イオンカラムクロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等を組み合せるか、溶解度差にもとづく硫安、アルコール等の分画手段によって、JNK3との相互作用やJNK3によるリン酸化を指標にして、実施可能である。好ましくは、該ペプチドのアミノ酸配列情報に基づき、該ペプチドに対する抗体を作製し、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体により特異的に吸着回収

する方法を用いる。

【0027】

(抗体)

抗体は、本発明に係るペプチドを抗原として用いて作製する。抗原は当該ペプチド、またはその断片でもよく、少なくとも8個、好ましくは少なくとも10個、より好ましくは少なくとも12個、さらに好ましくは15個以上のアミノ酸で構成される。このアミノ酸配列は、必ずしも配列表の配列番号1と相同である必要はなく、蛋白質の立体構造上の外部への露出部位が好ましく、露出部位のアミノ酸配列が1次構造上で不連続であっても、該露出部位について連続的なアミノ酸配列であればよい。抗体は、免疫学的に本発明に係るペプチドを結合または認識する限り特に限定されない。この結合または認識の有無は、公知の抗原抗体結合反応によって決定される。

【0028】

抗体を产生するためには、自体公知の抗体作製法を利用できる。例えば、本発明に係るペプチドを、アジュvantの存在または非存在下で単独または担体に結合して動物に投与し、体液性応答および/または細胞性応答等の免疫誘導を行うことにより得られる。担体は、それ自体が宿主に対して有害作用をおこさなければ特に限定されず、例えばセルロース、重合アミノ酸、アルブミン等が例示される。免疫される動物は、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウマ等が好適に用いられる。

【0029】

ポリクローナル抗体は、上記免疫手段を施された動物の血清から自体公知の抗体回収法によって取得される。好ましい手段として免疫アフィニティクロマトグラフィー法により得られる。

【0030】

モノクローナル抗体を生産するためには、上記の免疫手段が施された動物から抗体産生細胞（例えば、脾臓またはリンパ節由来のリンパ球）を回収し、自体公知の永久増殖性細胞（例えば、P3X63Ag8株等のミエローマ株）への形質転換手段を導入することによって行われる。例えば、抗体産生細胞と永久増殖性

細胞とを自体公知の方法で融合させてハイブリドーマを作製してこれをクローン化し、上記ペプチドを特異的に認識する抗体を産生するハイブリドーマを選別し、該ハイブリドーマの培養液から抗体を回収する。

【0031】

かくして得られた、本発明に係るペプチドを認識し結合しうるポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体は、本発明に係るペプチドの精製用抗体、試薬、または標識マーカー等として利用できる。

【0032】

(同定方法)

本発明に係るペプチドこれらをコードするポリヌクレオチドおよびその相補鎖、当該ポリヌクレオチドを含むベクター、当該ペプチドおよび当該ポリヌクレオチドのアミノ酸配列および塩基配列の情報に基づき形質転換させた細胞、またはこれらを用いる蛋白質合成系並びに当該ペプチドを免疫学的に認識する抗体は、単独でまたは複数を組み合せることによって、当該ペプチドの活性阻害剤または活性促進剤、あるいは該ポリヌクレオチドの発現阻害剤または発現促進剤の同定に有効な手段を提供する。同定方法は自体公知の医薬品スクリーニングシステムを利用して構築可能である。被検化合物としては、例えば化学ライプラリーや天然物由来の化合物、または本発明に係るペプチドの立体構造に基づいてドラッグデザインして得られた化合物などが挙げられる。

【0033】

詳しくは、本発明に係るペプチドと、被検化合物との間の相互作用を可能にする条件を選別し、この相互作用の有無を検出することのできるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を導入し、このシグナルおよび／またはマーカーの存在、不存在、またはその変化を検出することにより、本発明に係るペプチドの活性を促進または阻害する化合物を同定可能である。例えば、本発明のペプチドとJNK3との相互作用やJNK3によるリン酸化を指標にして、当該相互作用やリン酸化を調節し得る化合物を選別すればよい。また、本発明に係るポリヌクレオチドと被検化合物との間の相互作用を可能にする条件を選別し、この相互作用の有無を検出することのできるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系

を導入し、このシグナルおよび／またはマーカーの存在、不存在、またはその変化を検出することにより、本発明に係るポリヌクレオチドの発現を促進または阻害する化合物を同定可能である。ここでシグナルとは、そのもの自体がその物理的または化学的性質により直接検出され得るものとし、マーカーとはそのものの物理的または生物学的性質を指標として間接的に検出され得るものと指す。シグナルとしてはルシフェラーゼ、GFP、および放射性同位体など、マーカーとしては、レポーター遺伝子、例えばクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子など、または検出用のtag、例えば6×Histagなど、公知のものが利用できる。これらのシグナルまたはマーカーの検出方法は、当業者には周知のものである。

【0034】

(c-Junのリン酸化阻害剤および転写活性化能の阻害剤並びに医薬組成物)

上記のように、本発明においてはKIAA1491complete(配列表の配列番号1)が、JNK3によりリン酸化されること、さらにJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することを見い出した。このことから、KIAA1491completeを用いてJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することにより、c-Junの転写活性化能を抑制することができ、さらにはJNK3によるc-Junのリン酸化により引き起こされる生理的現象、例えばアボトーシスを抑制することが可能と考えられる。

【0035】

KIAA1491complete(配列表の配列番号1)と同様に、上記KIAA1491completeを含むペプチドは、JNK3と相互作用してJNK3とc-Junとの相互作用を阻害すると考えられる。また、上記KIAA1491completeの部分配列を有するペプチドであって、JNK3とKIAA1491completeとの相互作用部位を含むペプチドのうちJNK3と相互作用し得るペプチドは、JNK3とc-Junとの相互作用を阻害できるため、JNK3によるc-Junのリン酸化阻害に利用できる。また、KIAA1491completeまたはその部分配列を有するペプチドまたはKIAA1491completeを含むペプチドのアミノ酸配列において1個ない

し数個のアミノ酸に変異、例えば置換、欠失、付加、または挿入など、を有するアミノ酸配列からなるペプチドであって、JNK3と相互作用し得るペプチドも、JNK3によるc-Junのリン酸化阻害に利用できる。これらのペプチドは、その性質として、JNK3と、KIAA1491 completeとの相互作用を阻害し得る。かかるペプチドは、KIAA1491 completeのアミノ酸配列に基づいて設計して自体公知の方法で合成し、JNK3と、KIAA1491 completeとの相互作用、例えばリン酸化を指標にして自体公知の方法で（実施例参照）阻害作用を確認することにより得ることができる。

【0036】

上記発見に基づいて、配列表の配列番号1に記載のペプチド、またはJNK3と相互作用する下記いずれかのペプチド；配列表の配列番号1に記載のペプチドの部分配列を有するペプチド；配列表の配列番号1に記載のペプチドを含むペプチド；これらいずれかのペプチドのアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド；からなるc-Junのリン酸化阻害剤、当該リン酸化阻害剤からなるc-Junの転写活性化能の阻害剤、上記いずれかのペプチドを用いることを特徴とするJNK3によるc-Junのリン酸化の阻害方法、並びに上記いずれかのペプチドによりJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することを特徴とするc-Junの転写活性化能の阻害方法が提供可能である。これらは、JNKのシグナル経路およびその機能を解明するための試薬として有用である。

【0037】

本明細書において、c-Junの転写活性化能の阻害剤とは、c-Junの特定DNA配列への結合、c-Junと協同して転写を行う他因子との結合など、c-Junを含む転写活性装置になんらかの形で作用することにより、最終的にc-Junが関与する転写活性を阻害するものを意味する。

【0038】

JNKシグナル経路が、ポリグルタミン病による細胞死のモデル系においてポリグルタミンを含む凝集体の中で活性化していること、またポリグルタミンによる細胞死をMKK4（JNKシグナルにおいてJNKの上流に位置し、JNKを

リン酸化して活性化せしめるMAPキナーゼキナーゼ4)やc-Junのドミナントネガティブ変異体が抑制することが報告されている[Yasuda, S. et al., *Genes to Cells* (1999) 4: 734-756]。さらに、アルツハイマー病の原因遺伝子アミロイド_プレカーサー_プロテイン(APP)の切断産物アミロイド β による細胞死にJNKが関与することも示されている[浦 誠司ら、*実験医学* (2001) 19: 1839-1844]。

【0039】

これらから、本発明に係るペプチドを用いてJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することにより、JNK3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患、例えば神経変性疾患など、の解明並びに防止および/または治療が可能になると考えられる。神経変性疾患としては、次に挙げる例に限定されるものではないが、ポリグルタミン病(例えばハンチントン病、脊髄小脳失調症、球脊髄性筋萎縮症、および歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症など)、並びにアルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、Lewy小体型痴呆症、多系統萎縮症、家族性筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、pick病、ファミリアル ブリティッシュ デメンチア(familial British dementia)、クロイツフェルト-ヤコブ(Creutzfeldt-Jakob)病、ゲルストマン-ストラッサー(Gerstmann-Strässler)症候群、狂牛病(ウシ海綿状脳症)(BSE)、およびニューロセルピン(neuroserpin)封入体を伴う家族性痴呆症などが挙げられる。したがって、上記ペプチド、上記リン酸化阻害剤、上記転写活性化能の阻害剤は、上記疾患の防止および/または治療剤、並びにこれらを用いることを特徴とする上記疾患の防止および/または治療方法に使用できる。

【0040】

また、蛋白質発現用のベクターやトランスポーターを用いて、本発明に係るペプチドであってJNK3と相互作用するペプチドをコードするポリヌクレオチド、例えば配列表の配列番号2に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチド、をインビボで発現させてJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害し、上記疾患を防止および/または治療することも可能である。目的のペプチドのインビボでの

発現は、公知の方法を利用して実施できる。例えば、本発明に係るペプチドであってJNK3と相互作用するペプチドをコードするポリヌクレオチドを処理加工して、核酸ベクター、例えば複製欠損レトロウイルスベクターなど、に挿入して対象の細胞中に送達することにより可能である。したがって、本発明に係るペプチドであってJNK3と相互作用するペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有してなる、JNK3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療剤も本発明の範囲に含まれる。

【0041】

かくして、本発明においては、上記本発明に係るペプチド、上記リン酸化阻害剤、上記転写活性化能の阻害剤、上記ポリヌクレオチド、上記ベクター、上記形質転換体、および上記抗体からなる群から選ばれる少なくとも1つを含有してなる医薬組成物を提供可能である。当該医薬組成物であって、JNK3によるc-Junのリン酸化を阻害する作用を有するものは、神経変性疾患など、の解明並びに防止および／または治療剤、並びにこれらを用いることを特徴とする上記疾患の防止および／または治療方法に使用できる。

【0042】

上記リン酸化阻害剤、上記転写活性化能の阻害剤、上記医薬組成物、または上記防止および／若しくは治療剤の処方および投与形態は、適当な医薬担体と組み合わせて処方することが好ましい。かかる処方は、治療上有効量の上記リン酸化阻害剤、上記転写活性化能の阻害剤、上記医薬組成物、または上記防止および／若しくは治療剤、さらに医薬上許容される担体または賦形剤を含む。かかる担体としては、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびそれらの混合物が挙げられるが、これらに限らない。処方は投与経路に適したものを選択すればよく、該処方は当業者によく知られている。

【0043】

上記リン酸化阻害剤、上記転写活性化能の阻害剤、上記医薬組成物、または上記防止および／若しくは治療剤の処方および投与形態は、単独で使用してもよく、あるいは治療に必要な他の化合物と一緒に使用してもよい。上記リン酸化阻害

剤、上記転写活性化能の阻害剤、上記医薬組成物、または上記防止および／若しくは治療剤の全身投与の好ましい一態様は、注射、例えば静脈注射が挙げられる。皮下、筋肉内または腹腔内のような他の注射経路を用いることもできる。投与の別の態様は、腸溶処方またはカプセル処方がうまく処方されるならば、経口投与も可能である。さらに、胆汁酸塩またはフシジン酸または他の界面活性剤のような浸透剤を用いる経粘膜または経皮投与を用いることもできる。投与は局所的なものであってもよく、膏薬、パスタ、ゲルなどの形態での投与であってもよい。

【0044】

必要な用量範囲は、上記リン酸化阻害剤、上記転写活性化能の阻害剤、上記医薬組成物、または上記防止および／若しくは治療剤の有効性、投与経路、処方の性質、対象の症状の性質、および担当医師の判断による。具体的には、適当な用量は、例えば対象の体重1kgあたり0.1ないし100μgの範囲である。しかしながら、当該分野においてよく知られた最適化のための一般的な常套的実験を用いてこれらの用量の変更を行うことができる。

【0045】

製剤化にあたっては蛋白質など各対象の物性に応じた公知の製剤化手段を導入すればよい。具体的には例えば、散剤、丸剤、錠剤、カプセル製剤、水溶液製剤、エタノール溶液製剤、リポソーム製剤、脂肪乳剤、シクロデキストリンなどの包接体などの製剤化方法が利用できる。

【0046】

散剤、丸剤、カプセル剤および錠剤は、ラクトース、グルコース、シュークロース、マンニトールなどの賦形剤、澱粉、アルギン酸ソーダなどの崩壊剤、マグネシウムステアレート、タルクなどの滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤、グリセリンなどの可塑剤などを用いて製造できる。錠剤やカプセルを製造するには、固体の製薬担体が用いられる。

【0047】

懸濁剤は、水、シュークロース、ソルビトール、フラクトースなどの糖類、P

E Gなどのグリコール類、油類を使用して製造できる。

【0048】

注射用の溶液は、塩溶液、グルコース溶液または、塩水とグルコース溶液の混合物からなる担体を用いて調製可能である。

【0049】

リポソーム化は例えば、リン脂質を有機溶媒（クロロホルムなど）に溶解した溶液に、当該物質を溶媒（エタノールなど）に溶解した溶液を加えた後、溶媒を留去し、これにリン酸緩衝液を加え、振盪、超音波処理および遠心分離した後、上清を濾過処理して回収することにより行い得る。

【0050】

脂肪乳剤化は例えば、当該物質、油成分（大豆油、ゴマ油、オリーブ油などの植物油、MCTなど）、乳化剤（リン脂質など）などを混合、加熱して溶液とした後に、必要量の水を加え、乳化機（ホモジナイザー、例えば、高圧噴射型、超音波型など）を用いて、乳化および均質化処理して行い得る。また、これを凍結乾燥化することも可能である。なお、脂肪乳剤化するとき、乳化助剤を添加してもよく、乳化助剤としては、例えば、グリセリン、糖類（例えば、ブドウ糖、ソルビトール、果糖など）が例示される。

【0051】

シクロデキストリン包接化は例えば、当該物質を溶媒（エタノールなど）に溶解した溶液に、シクロデキストリンを水などに加温溶解した溶液を加えた後、冷却して析出した沈殿を濾過し、滅菌乾燥することにより行い得る。この際、使用されるシクロデキストリンは、当該物質の大きさに応じて、空隙直径の異なるシクロデキストリン（ α 、 β 、 γ 型）を適宜選択すればよい。

【0052】

【実施例】

以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

【実施例1】

（JNK3と相互作用する蛋白質のインシリコでの探索）

JNK3と相互作用する蛋白質を、国際公開第WO01/67299号公報に記載の予測方法にしたがってインシリコ(in silico)で予測した。すなわち、JNK3のアミノ酸配列のある長さのオリゴペプチドに分解し、各オリゴペプチドのアミノ酸配列あるいはそのアミノ酸配列と相同的なアミノ酸配列を持った蛋白質をデータベース中で検索し、得られた蛋白質とJNK3との間でローカルアライメントを行い、ローカルアライメントのスコアの高いものをJNK3と相互作用すると予測した。ここではローカルアライメントのスコアを、国際公開第WO01/67299号公報に記載の方法と同様に、25.0以上とした。また、JNK3は脳神経系に特異的に発現する蛋白質であり、低酸素状態などのショック的状況で発現し脳機能に障害を与えることが分かっているので、JNK3と相互作用する蛋白質の候補は、脳で発現し重要な機能を持っている既知の蛋白質に絞った。

【0053】

この結果、JNK3由来の6アミノ酸残基からなるオリゴペプチドQGFDKQと相同性あるオリゴペプチドQTFDKQが、機能未知の蛋白質KIAA1491のアミノ酸配列中に存在することが分かった。図1に、JNK3とKIAA1491とのローカルアライメントの結果を示した。

【0054】

(完全長KIAA1491の塩基配列決定)

KIAA1491はかずさDNA研究所データベースHUGEによるとN末端が欠失している可能性があったので、N末端側領域をコードしているcDNA配列をインシリコにより予測した。まずKIAA1491の5'末端120塩基をblastn検索し、QV1-MT0132-201100-498-b05 MT0132 Homo sapiens cDNA (GenBank、アクセス番号: BF894928)と120塩基に渡り100%の相同性を示すを見い出した。KIAA1491の第1~120番目の塩基がBF894928の第358~477番目の塩基に相当することから、BF894928はKIAA1491の上流配列を有していると考えられた。次いで、BF894928をKIAA1491と同一フレームでインシリコ翻訳して得られる上流から第

2番目のメチオニンをファーストメチオニンと考え、対応するmRNAが脳に存在することを、ヒト脳由来のpolyA RNAを用いたRT-PCRにより確認した。このメチオニンまで上流域を延長したcDNAがコードする蛋白質（配列表の配列番号1）をKIAA1491completeと呼ぶ。以下のリン酸化実験では、KIAA1491completeを用いた。

【0055】

（JNK3によるc-Junのリン酸化に対するKIAA1491completeの作用解析）

【0056】

＜材料＞

活性化型ヒトJNK3は、N末端ヒスチジンタグ（His-tag）付加蛋白質（以下、His-JNK3）として調製した。まず、ヒト海馬cDNAライブラリーを鋳型としてRT-PCRにより得たヒトJNK3（JNK3α1）cDNAを、pFASTBAC HT（Invitrogen社）に挿入し、添付の説明書に従い、His-JNK3発現用組換えバキュロウイルスを作製した。次に、作製した組換えウイルスをSf9細胞に感染させてHis-JNK3を発現させ、プロボンドレジン（Probond Resin）（Invitrogen社）で精製して使用した。

【0057】

c-Jun（1-79）（c-JunのN末端79アミノ酸領域であり、JNKによるリン酸化部位を含む）は、N末端GST融合蛋白質（以下、GST-c-Jun（1-79））として大腸菌にて発現後、グルタチオンセファロース4B（Glutathione sepharose 4B）（Amersham Pharmacia biotech社）で精製して使用した。

【0058】

KIAA1491completeは、N末端GST融合蛋白質（以下、GST-KIAA1491complete）として大腸菌にて発現後、Glutathione sepharose 4B（Amersham Pharmacia biotech社）で精製して使用した。すなわち、ヒト脳cDNAを鋳

型として、KIAA1491 completeのORF領域をPCRにより増幅後、ゲートウェイクローニングテクノロジー(Invitrogen社)を用いてpDEST15ベクター(Invitrogen社)に組み込み、大腸菌用GST-KIAA1491 complete発現ベクターを構築した。当該ベクターを大腸菌BL21-SI株(Invitrogen社)に導入後、100μg/mlのアンピシリンを含むLBON培地中(NaClを含まないLB培地)にて37℃で培養後、NaClを終濃度0.3Mとなるように添加し、さらに25℃で培養してGST-KIAA1491 completeの発現を誘導した。菌体を回収して抽出液を調整し、Glutathione sepharose 4Bを用いてGST-KIAA1491 completeを精製した。精製蛋白質は透析後に使用した。

【0059】

<インビトロ リン酸化実験(Invitro kinase assay)>

1μgの各GST融合タンパク質(GST-KIAA1491 complete、GST-c-Jun(1-79)、またはGST)と活性化型JNK3(0、14、28、または70ng)を、5μCiの[γ-³²P]ATP(アデノシン三リン酸)(3000Ci/mmol、NEN社)を含むカイネーションバッファー(kination buffer)(25mM Tris-HCl, pH7.5/5mM β-グリセロホスフェート/2mM ジチオスレイトール(DTT)/0.1mM Na₃VO₄/10mM MgCl₂/10μM ATP)中にて30℃で30分間インキュベーションすることにより、リン酸化反応を行った。反応後、等量の2×SDSサンプルバッファー[4% SDS/125mM Tris-HCl, pH6.8/20% グリセロール/0.01% ブロムフェノールブルー(BPB)/10% β-メルカプトエタノール(mercaptoethanol)]を加え、100℃で5分間処理した後、5-20% SDS-PAGEにより蛋白質を分離し、BAS2000(Fuji film社)を用いたオートラジオグラフィーによりリン酸化蛋白質を検出した。

【0060】

1 μ gのGST-c-Jun (1-79) と活性化型JNK3 (70ng) を、GSTまたはGST-KIAA1491 complete (共に1 μ gまたは2 μ g) の存在下または非存在下で、100 μ MのATPを含むカイネーションバッファー中にて、30℃で20分間インキュベーションすることにより、リン酸化反応を行った。反応後、等量の2×SDS サンプルバッファーを加え、100℃で5分間処理した後、上清を10%SDS-PAGEにより分離し、1次抗体として抗リン酸化c-Jun (S63) 抗体 (anti-Phospho-c-Jun (S63) antibody) (New England Biolabs社) を、2次抗体としてホースラディッシュ_ペーオキシダーゼ結合抗ウサギIgG抗体 (HRP-conjugated anti-rabbit IgG antibody) (Amersham pharmacia biotech社) を用いたイムノプロッティングによりリン酸化されたGST-c-Jun (1-79) を検出した (図2)。検出にはECLウエスタンプロッティング_ディテクション_キット (Amersham pharmacia biotech社) を使用した。さらに、検出されたリン酸化GST-c-Jun (1-79) のバンド強度を画像解析ソフト、Intelligent Quantifier (Bio Image社) を用いて定量し、GSTまたはGST-KIAA complete 存在下でのバンド強度を、非存在下での強度を100%としたときの相対強度で示した (表1)。

【0061】

＜結果＞

JNK3によりGST-KIAA1491 completeのリン酸化が認められた。また、このリン酸化がJNK3の用量依存的であったことから、GST-KIAA1491 completeのリン酸化は自己リン酸化ではなくJNK3によるものであることが明らかになった。このことから、JNK3とKIAA1491 completeとが相互作用することが判明した。

【0062】

また、図2および表1に示したように、1 μ gまたは2 μ gのGST-KIA

A1491 complete 存在下では、JNK3によるGST-c-Jun (1-79) のリン酸化が約30%阻害された。一方、陰性コントロールであるGST存在下ではJNK3によるGST-c-Jun (1-79) のリン酸化に変化はなかった。これらから、JNK3によるGST-c-Jun (1-79) のリン酸化がKIAA1491 complete により阻害されることが明らかになった。

【0063】

【表1】

添加した蛋白質	添加量 (μ g)	相対強度 (%)
なし		100
GST	1.0	92.7
	2.0	93.6
GST-KIAA1491 complete	1.0	71.5
	2.0	67.1

【0064】

【発明の効果】

本発明においては、ヒト蛋白質KIAA1491の全長アミノ酸配列を決定し(以下、KIAA1491 complete)、KIAA1491 complete がJNK3によりリン酸化されること、さらにJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することを見い出した。c-Junはトランスアクチベーターであり転写活性化能を有することが知られている。また、神経細胞死が認められる疾患、例えばポリグルタミン病やアルツハイマー病、においてJNK3の関与が認められている。したがって、KIAA1491 complete を用いてJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することにより、c-Junの転写活性

化能を抑制することができ、さらにはJNK3によるc-Junのリン酸化により引き起こされる生理的現象、例えばアポトーシスを抑制することが可能と考えられる。

これらのことから本発明は、KIAA1491 complete、またはJNK3と相互作用する下記ペプチド；KIAA1491 completeの部分配列を含むペプチド；KIAA1491 completeを含むペプチド；これらのアミノ酸配列において1ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド；によりJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することを特徴とする、c-Junの機能抑制、例えば転写活性化能抑制；これを用いたアポトーシス抑制、例えば神経細胞のアポトーシス抑制；並びに神経変性疾患などの防止および／または治療；に用いる薬剤、医薬組成物およびその方法を提供可能であり、またJNKシグナル経路およびその機能の研究のために非常に有用である。

特2002-095442

【0065】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> CELESTAR LEXICO-SCIENCES, INC.

DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> A c-Jun phosphorylation inhibitor (KIAA1491 complete)

<130> NP02-1027

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 786

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Pro Gly Thr Gly Ser Ser Thr Ala Val Asn Ser Cys Ser Pro

1

5

10

15

Gln Ser Leu Ser Ser Val Leu Gly Ser Gly Phe Gly Glu Leu Ala Pro

特2002-095442

20

25

30

Pro Lys Met Ala Asn Ile Thr Ser Ser Gln Ile Leu Asp Gln Leu Lys

35

40

45

Ala Pro Ser Leu Gly Gln Phe Thr Thr Thr Pro Ser Thr Gln Gln Asn

50

55

60

Ser Thr Ser His Pro Thr Thr Thr Ser Trp Asp Leu Lys Pro Pro

65

70

75

80

Thr Ser Gln Ser Ser Val Leu Ser His Leu Asp Phe Lys Ser Gln Pro

85

90

95

Glu Pro Ser Pro Val Leu Ser Gln Leu Ser Gln Arg Gln Gln His Gln

100

105

110

Ser Gln Ala Val Thr Val Pro Pro Pro Gly Leu Glu Ser Phe Pro Ser

115

120

125

Gln Ala Lys Leu Arg Glu Ser Thr Pro Gly Asp Ser Pro Ser Thr Val

130

135

140

Asn Lys Leu Leu Gln Leu Pro Ser Thr Thr Ile Glu Asn Ile Ser Val

145

150

155

160

Ser Val His Gln Pro Gln Pro Lys His Ile Lys Leu Ala Lys Arg Arg

165

170

175

特2002-095442

Ile Pro Pro Ala Ser Lys Ile Pro Ala Ser Ala Val Glu Met Pro Gly

180 185 190

Ser Ala Asp Val Thr Gly Leu Asn Val Gln Phe Gly Ala Leu Glu Phe

195 200 205

Gly Ser Glu Pro Ser Leu Ser Glu Phe Gly Ser Ala Pro Ser Ser Glu

210 215 220

Asn Ser Asn Gln Ile Pro Ile Ser Leu Tyr Ser Lys Ser Leu Ser Glu

225 230 235 240

Pro Leu Asn Thr Ser Leu Ser Met Thr Ser Ala Val Gln Asn Ser Thr

245 250 255

Tyr Thr Thr Ser Val Ile Thr Ser Cys Ser Leu Thr Ser Ser Ser Leu

260 265 270

Asn Ser Ala Ser Pro Val Ala Met Ser Ser Ser Tyr Asp Gln Ser Ser

275 280 285

Val His Asn Arg Ile Pro Tyr Gln Ser Pro Val Ser Ser Ser Glu Ser

290 295 300

Ala Pro Gly Thr Ile Met Asn Gly His Gly Gly Gly Arg Ser Gln Gln

305 310 315 320

Thr Leu Asp Thr Pro Lys Thr Thr Gly Pro Pro Ser Ala Leu Pro Ser

325 330 335

特2002-095442

Val Ser Ser Leu Pro Ser Thr Thr Ser Cys Thr Ala Leu Leu Pro Ser

340 345 350

Thr Ser Gln His Thr Gly Asp Leu Thr Ser Ser Pro Leu Ser Gln Leu

355 360 365

Ser Ser Ser Leu Ser Ser His Gln Ser Ser Leu Ser Ala His Ala Ala

370 375 380

Leu Ser Ser Ser Thr Ser His Thr His Ala Ser Val Glu Ser Ala Ser

385 390 395 400

Ser His Gln Ser Ser Ala Thr Phe Ser Thr Ala Ala Thr Ser Val Ser

405 410 415

Ser Ser Ala Ser Ser Gly Val Ser Leu Ser Ser Ser Met Asn Thr Ala

420 425 430

Asn Ser Leu Cys Leu Gly Gly Thr Pro Ala Ser Ala Ser Ser Ser

435 440 445

Ser Arg Ala Ala Pro Leu Val Thr Ser Gly Lys Ala Pro Pro Asn Leu

450 455 460

Pro Gln Gly Val Pro Pro Leu Leu His Asn Gln Tyr Leu Val Gly Pro

465 470 475 480

Gly Gly Leu Leu Pro Ala Tyr Pro Ile Tyr Gly Tyr Asp Glu Leu Gln

特2002-095442

485

490

495

Met Leu Gln Ser Arg Leu Pro Val Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Phe Ala

500

505

510

Ala Pro Thr Ala Leu Ala Ser Arg Asp Arg Ser Leu Ala Asn Asn Pro

515

520

525

Tyr Pro Gly Asp Val Thr Lys Phe Gly Arg Gly Asp Ser Ala Ser Pro

530

535

540

Ala Pro Ala Thr Thr Pro Ala Gln Pro Gln Gln Ser Gln Ser Gln Thr

545

550

555

560

His His Thr Ala Gln Gln Pro Phe Val Asn Pro Ala Leu Pro Pro Gly

565

570

575

Tyr Ser Tyr Thr Gly Leu Pro Tyr Tyr Thr Gly Met Pro Ser Ala Phe

580

585

590

Gln Tyr Gly Pro Thr Met Phe Val Pro Pro Ala Ser Ala Lys Gln His

595

600

605

Gly Val Asn Leu Ser Thr Pro Thr Pro Pro Phe Gln Gln Ala Ser Gly

610

615

620

Tyr Gly Gln His Gly Tyr Ser Thr Gly Tyr Asp Asp Leu Thr Gln Gly

625

630

635

640

特2002-095442

Thr Ala Ala Gly Asp Tyr Ser Lys Gly Gly Tyr Ala Gly Ser Ser Gln

645

650

655

Ala Pro Asn Lys Ser Ala Gly Ser Gly Pro Gly Lys Gly Val Ser Val

660

665

670

Ser Ser Ser Thr Thr Gly Leu Pro Asp Met Thr Gly Ser Val Tyr Asn

675

680

685

Lys Thr Gln Thr Phe Asp Lys Gln Gly Phe His Ala Gly Thr Pro Pro

690

695

700

Pro Phe Ser Leu Pro Ser Val Leu Gly Ser Thr Gly Pro Leu Ala Ser

705

710

715

720

Gly Ala Ala Pro Gly Tyr Ala Pro Pro Pro Phe Leu His Ile Leu Pro

725

730

735

Ala His Gln Gln Pro His Ser Gln Leu Leu His His His Leu Pro Gln

740

745

750

Asp Ala Gln Ser Gly Ser Gly Gln Arg Ser Gln Pro Ser Ser Leu Gln

755

760

765

Pro Lys Ser Gln Ala Ser Lys Pro Ala Tyr Gly Asn Ser Pro Tyr Trp

770

775

780

Thr Asn

785

<210> 2

<211> 3006

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atggcaccag ggactggcag ctccactgcc gtcaactcct gtttcctca gagcctgtca 60
tccgtcccttgc gtcaggatt tggagagctt gcaccaccaa aaatggcaaa catcaccagc 120
tcccagattt tggaccagtt gaaagctccg agtttggcc agtttaccac caccccaagt 180
acacagcaga atagtacaag tcaccctaca actactactt cttgggaccc caagccccca 240
acatcccagt cctcagtcct cagtcattt gacttcaaat ctcaacctga gccatccccca 300
gttcttagcc agttgagcca gcgacaacag caccagagcc aggcagtcac ttttcctcc 360
cctggtttgg agtcccttcc ttcccaggca aaacttcgag aatcaacacc tggagacagt 420
ccctccactg tgaacaagct ttgcagctt cccagcacga ccattgaaaa tatctctgtg 480
tctgtccacc agccacagcc caaacacatc aaacttgcta agcggcggat acccccagct 540
tctaagatcc cagttctgc agtggaaatg cctggtagcag cagaatgtcac aggattaaat 600
gtgcagtttgg gggctctgga atttgggtca gaaccttctc tctctgaatt tggatcagct 660
ccaaggcgtg aaaatagtaa tcagattccc atcagttgt attcgaagtc tttaagttag 720
cccttgaata catctttatc aatgaccagt gcagttacaga actccacata tacaacttcc 780
gtcattaccc cctgcagtc gacaagctca tcactgaatt ctgcgtgtcc agtagcaatg 840
tcttcctctt atgaccagag ttctgtgcat aacaggatcc cataccaaag ccctgtgagt 900
tcatcagagt cagctccagg aaccatcatg aatggacatg gtgggtgtcg aagtcagcag 960
acactagaca ctccaaagac aacaggccct ccctctgccc tcccgtctgt gagctccctg 1020
cccagcacca cctcctgcac tgcacttctg ccgtccacat cccagcacac tggcgaccc 1080
actagcagcc ctctctctca gcttagcagt tcgctctcca gccaccagag cagcctctct 1140
gcacatgcag ccctctccctc gaggcacgtca cacacacatg ccagtgtgga gagcgcctct 1200
tcccaccagg cctcagccac cttctccacg gcagcgcaccc ccgtctcaag ttccgcattcc 1260

tcaggcgta gcctgtccag tagcatgaac accgcgaaca gcctctgtct ggggggacc 1320
 cccgcgagtg catccagcag cagtagcagg gccgcgcctt tggtgaccc aggcaaagca 1380
 cccccaact tacctcaggg ggtgcctccc ctgctgcaca accagtagt 1440
 ggaggactgc ttccgccta cccgatctat ggctatgacg agctccagat gctgcagtca 1500
 cggctgccag tggactacta tggattccc tttgctgcac ccacagcgct tgccagccga 1560
 gatgggagcc tagctaataa tccatatacca ggtgatgtca caaaggttgg ccgtggggac 1620
 tctgcattccc ctgcacccgc taccacacca gtcagccac agcagagcca atcacagacc 1680
 caccacacag cccagcagcc cttcgtaat cctgcactgc cacctggcta tagtacact 1740
 ggtcttccct actacacagg catgcccagt gccttccagt atggcccccac catgtttgtc 1800
 cctccagcct cagccaagca acatggggtg aacctcagca ctccccacacc tcccttccag 1860
 caggccagtg gttatggcca gcacggctac agtacagggtt atgacgaccc gacccagggg 1920
 acagcagcag gagactactc caaagggtgc tatgctggat catgcaggc accaaacaag 1980
 tctgcaggtt ctggcctgg caaaggagta tcagtgctt caagcaccac tggctacact 2040
 gatatgactg gttctgtcta caataagaca cagactttt acaagcaggg atttcatgca 2100
 gggacgcctc cacccttcag cctgcctcg gtcttggct ccactgggcc cctggcctcg 2160
 ggagcggccc ctggctatgc accccacca ttccctacaca tcttgcagc ccaccaggcag 2220
 cccccactcac agctgctgca ccaccaccc ttccctacaca tcttgcagc ccaccaggcag 2280
 cgcagccagc ccagctccct gcagcccaag tctcaaggct ccaaacctgc ctacggcaac 2340
 tctccatact ggacaaacta aacccagaag agaggggtgg gctggggcaa ggcttacact 2400
 gggcaggaga gaacacacga gcacgtattt gggagccag tgcccttcc tagaattccc 2460
 gacatgtgtc agccatgcct ctgtggggag tctgcctccc agactggcta ctgtatgtaa 2520
 tgtatttatg tatgtatttg taaatgtat agaagtctgg gggggagttt gggatggcg 2580
 gcagatgtta gccaggctcg ccctcccat tcaagccct tctccactgt agcaaaataa 2640
 gcacccaccc cccatctgccc ttccaggctt ctgcacagcc tgcaactgccc agtggccac 2700
 tagggcagt ctctggagg gctggttcaa ggctgtttgg gtataggggt caggtaccaa 2760
 tgaagaatca cgacttgtct cactccttgc gaaattgttt tcttcctgt gtaattactt 2820
 cataccctcg ttttgagaa actgttccgt ttgtcatctg tcatggtctc cttccaccaa 2880
 atcttcatct ggaaatagca gcggtatccc tccacccaag tatggccacc tggttgcctt 2940
 catatagaac agggcattct ggtctggtca tgccctaga gacttactag agactggctg 3000

特2002-095442

accatg

3006

【図面の簡単な説明】

【図1】 JNK3とKIAA1491との相互作用をインシリコで予測した結果を示す図面である。

【図2】 JNK3によるc-Junのリン酸化をKIAA1491 completeが阻害することを示す図面である。レーン1は、JNK3によるc-Jun (1-79) のリン酸化反応に他の蛋白質を無添加のとき、レーン2および3はGSTをそれぞれ1 μgおよび2 μg、レーン4および5はGST-KIAA1491 completeをそれぞれ1 μgおよび2 μg添加したときの結果を示す。矢頭はリン酸化されたc-Jun (1-79) を示す。

特2002-095442

【書類名】 図面
【図1】

>Score = 38.1

413 QPSPSGAAVNSSES LPPSSSVND ISSMSTDQTL
374 QSSATFSTAATSVSSSASSGVSLSSSMNTANSL
Q S S S V SSM T L

>Score = 35.3

415 SPSGAAVNSSES LPPSSSVND ISSMSTDQTL AS DT DSS LEASA
382 AATVSSSASSGVSLSSSMNTANSL CLGGTPASASSSSRAAP
S SSS N S T AS SS A

>Score = 25.7

22 QGFDKQ
662 QTFDKQ
Q FDKQ

>Score = 26.1

181 HSAGIIHRDLKPSN
39 HPTTTTSWDLKPPT
H DLKP

>Score = 26.1

416 PSGAAVNSSES LPPSSSVND ISSMSTDQTL
265 PYQSPVSSSES-APGTIMNGHGGGRSQTL
P V SSES P N QTL

>Score = 25.8

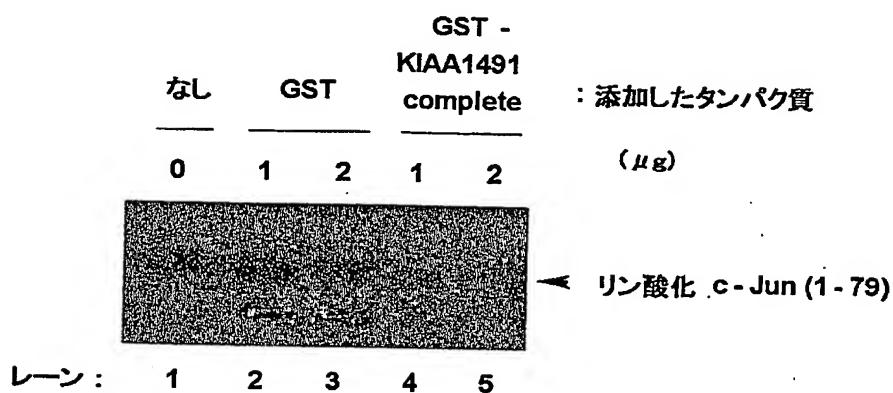
417 SGAAVNSSES LPPSSSVND ISSMSTDQTL AS DT
328 TGDLTSSPLSQLSSSLSSHQSSL SAHAALSSST
G S S SS SS S L S T

>Score = 26.5

414 PSPSGAAVNSSES LPPSSSVND ISSMSTDQTL AS-DT DSS LEASA
333 SSPLSQLSSSLSSHQSSL SAHAALSSST SHASVESASSHQSSA
SP S S S S ST T AS SS SA

特2002-095442

【図2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 JNK3シグナル経路の阻害物質を見い出し、JNK3シグナル経路の異常に基づく疾患、例えば神経変性疾患などの疾患、の防止および／または治療手段を提供すること。

【解決手段】 配列番号1のアミノ酸配列からなるペプチド(A)、ペプチド(A)を含有するペプチド、ペプチド(A)の部分配列を有するペプチドまたはペプチド(A)のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド、およびこれらをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを保有するベクター、形質転換体、前記ペプチドに対する抗体、前記ペプチドであってJNK3と相互作用するペプチドによりJNK3によるc-Junリン酸化を阻害することによるc-Junの転写活性化能の抑制、これを利用したアポトーシス抑制、並びにポリグルタミン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患の防止および／または治療、に用いる薬剤、医薬組成物およびその方法。

【選択図】 なし

特2002-095442

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-095442
受付番号	50200457109
書類名	特許願
担当官	第五担当上席
作成日	0094 平成14年 4月 1日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成14年 3月29日

次頁無

特2002-095442

出願人履歴情報

識別番号 [500520628]

1. 変更年月日 2000年10月26日

[変更理由] 新規登録

住 所 千葉県千葉市美浜区中瀬1丁目3番地 幕張テクノガーデンD
17

氏 名 セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社

特2002-095442

出願人履歴情報

識別番号 [000002831]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区日本橋3丁目14番10号
氏 名 第一製薬株式会社